

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Žgela

**Utjecaj rezistencije izoliranih uzročnika na
ishod liječenja bolesnika s Gram negativnom
sepsom u Zavodu za intenzivnu medicinu
Kliničkog bolničkog centra Zagreb**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Kristina Žgela

**Utjecaj rezistencije izoliranih uzročnika na
ishod liječenja bolesnika s Gram negativnom
sepsom u Zavodu za intenzivnu medicinu
Kliničkog bolničkog centra Zagreb**

DIPLOMSKI RAD



Zagreb, 2017.

Ovaj diplomski rad izrađen je u Zavodu za intenzivnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb pod vodstvom prof.dr.sc. Radovana Radonića i predan je na ocjenu u akademskoj godini 2016./2017.

Popis kratica:

A. baumannii = *Acinetobacter baumannii*

AN = amikacin

BIS = bolnički informacijski sustav

CAZ = ceftazidim

CIP = ciprofloksacin

E. coli = *Escherichia coli*

EUCAST = The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEP = cefepim

GM = gentamicin

IL – 1 = interleukin 1

IPM = imipenem

KBC = Klinički bolnički centar

Kl. Spp = *Klebsiella spp*

KOL = kolistin

kPa = kilo Paskal (mjera za tlak)

MAP = mean arterial pressure (srednji arterijski tlak)

MEM = meropenem

mmHg = milimetar žive (mjera za tlak)

P. aeruginosa = *Pseudomonas aeruginosa*

pCO₂ = parcijalni tlak ugljikovog dioksida

qSOFA = quick Sequential Organ Failure Assesment

S. aureus = *Staphylococcus aureus*

S. epidermidis = *Staphylococcus epidermidis*

S. maltophilia = *Stenotrophomonas maltophilia*

SOFA = Sequential Organ Failure Assesment

SPSS = Statistical Package for the Social Sciences

TZP = piperacilin/tazobaktam

Sadržaj

1. Sažetak	1
2. Summary	2
3. Uvod.....	3
4. Hipoteza.....	8
5. Ciljevi rada	8
5.1. Glavni cilj rada.....	8
5.2. Specifični ciljevi	8
6. Ispitanici i metode	9
7. Rezultati.....	10
8. Rasprava	18
9. Zaključci	21
10. Zahvale	21
11. Literatura	22
12. Životopis.....	26

1. Sažetak

Kristina Žgela

Utjecaj rezistencije izoliranih uzročnika na ishod liječenja bolesnika s Gram negativnom sepsom u Zavodu za intenzivnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb

Sepsa je upalni odgovor organizma na prisutnost bakterija i njihovih toksina u organizmu. Liječenje sepse temelji se na eradikaciji uzročnika, održavanju hemodinamike i liječenju organske disfunkcije. Mnogi uzročnici sepse razvili su rezistenciju na antibiotike te empirijska terapija ponekad nije učinkovita, što može rezultirati nepovoljnim ishodom. Istraživanje je temeljeno na retrospektivnoj studiji populacije bolesnika liječenih u Zavodu za intenzivnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb u trogodišnjem razdoblju od 01.01.2013. do 31.12.2015. tijekom kojeg su zabilježene 1962 hospitalizacije. Podaci o broju bolesnika, izolatima te antibiogramima prikupljeni su iz aplikacije bis (bolnički informacijski sustav) te bili upisivani u tabličnom obliku, a nakon toga statistički obrađeni u programu Statistical Package for the Social Sciences (SPSS). Iz pozitivnih hemokultura bilježena je osjetljivost izoliranih Gram negativnih uzročnika i promatran je ishod bolesnika. Udio bolesnika hospitaliziranih u Zavodu s dokazanom Gram negativnom sepsom konstantan je kroz trogodišnje razdoblje i kreće se oko 7%. *Pseudomonas aeruginosa* je najčešći izolat u bolesnika s Gram negativnom sepsom s visokim udjelom rezistencije 29 od 53 izolata, odmah nakon *Acinetobacteria* u kojeg je 25 od 27 izolata multirezistentno. Učestalost izolata *P. aeruginosa* u bolesnika s Gram negativnom sepsom raste kroz promatrano razdoblje od tri godine. Ishod je najnepovoljniji kod miješane Gram negativne sepse uzrokovane s dva ili više uzročnika, a od pojedinačnih uzročnika najnepovoljniji je kod infekcije uzrokovane nonfermentorima *P. aeruginosa* i *A. baumannii* u kojih je i udio rezistencije najveći. Bolesnici s Gram negativnom sepsom uzrokovanom multirezistentnim bakterijskim sojevima imaju značajno veću smrtnost od bolesnika čija je sepsa uzrokovana osjetljivom sojevima.

Ključne riječi

Gram negativna sepsa, multirezistentnost, smrtni ishod, intenzivna

2. Summary

Kristina Žgela

The impact of isolated bacteria resistance on treatment outcome in patients with Gram negative sepsis at the Intensive Care Unit at University Hospital Centre Zagreb

Sepsis is a clinical syndrome that occurs as the result of invasion of bacteria and their toxins into the circulation which causes an inflammatory system response. The treatment of sepsis is based on the eradication of isolated microorganisms, maintenance of haemodynamics and treatment of organ dysfunction. Most causes of sepsis developed a resistance to antibiotics. Therefore, empiric antibiotic therapy can be inefficient, which can result with an adverse outcome. A three – year retrospective study was conducted in patients hospitalized at the Intensive care unit in University Hospital Centre Zagreb from 1 January 2013 until 31 December 2015. During this period 1962 patients were observed. Data about numbers of patients, isolated microorganisms and results of antibiograms were collected from his application (hospital system of informatization), written up in tables and statistically processed in the Statistical Package for the Social Sciences SPSS. Resistance of Gram negative microorganisms and outcome of patients were collected.

The percentage of patients with Gram negative sepsis hospitalized in the Department was stable and around 7%. *P. aeruginosa* was the most common isolate, with a high percentage of multiresistance (29/35 isolates), right after *A. baumannii* (25/27). The incidence of *P. aeruginosa* isolates bacteria on the increase. The outcome was the worst in mixed Gram negative sepsis caused with 2 or more microorganisms, while among individual bacterial species the outcome was the worst in infections caused by non fermenters *P. aeruginosa* and *A. baumannii*, which have the highest percentage of multiresistance. Patients with Gram negative sepsis caused by multiresistant bacterial strains had a significantly higher mortality than patients with sepsis caused by sensitive strains.

Keywords

Gram negative sepsis, multiresistant, mortality, intensive care

3. Uvod

Sepsa, teška sepsa i septični šok su upalna stanja koja nastaju zbog sistemske bakterijske infekcije (1). Sepsa je klinički sindrom koji nastaje kao posljedica prodora bakterija i gljiva, odnosno njihovih toksina, u cirkulaciju što rezultira općim upalnim odgovorom. Smrtnost od sepse iznosi oko 30%. Sepsu možemo podijeliti prema mjestu sticanja na domicilnu, odnosno izvanbolničku te nozokomijalnu, odnosno bolničku. Prema ulaznom mjestu sepsu dijelimo na primarnu, kojoj je ulazno mjesto nepoznato ili se nalazi intravaskularno, te na sekundarnu sepsu kod koje postoji infekcijsko žarište iz kojeg je nastupila bakterijemija (prodor bakterija u krv). Najčešći uzročnici izvanbolničke sepse su enterobakterije, posebno *Escherichia coli*, koje zauzimaju oko trećinu izvanbolničkih sepsi, dok je u bolničkim sepsama u 50 – 70% slučajeva sepsi uz enterobakterije uzročnik *Pseudomonas* (2).

Najčešća mjesta infekcije su respiratorni te gastrointestinalni sustav, a nakon njih po učestalosti slijede mokraćni sustav te koža i potkožje. Raspodjela uzročnika sepse po organskim sustavima prikazana je u tablici 1 (1).

Tablica 1. Izolirani uzročnici po organskim sustavima (izvor za podatke u tablici: tekst s web stranice <http://emedicine.medscape.com/article/168402-overview#a3>)

Organski sustav	Uzročnici	
	Gram negativni	Gram pozitivni
Donji respiratorni sustav 35 – 50%	<i>K. pneumoniae</i> <i>E.coli</i> <i>Haemophilus spp</i> <i>Pseudomonas spp</i>	<i>S. pneumoniae</i> <i>Legionella spp</i> <i>S. aureus</i>
Gastrointestinalni sustav 20 – 40%	<i>E.coli</i> <i>Acinetobacter spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Enterobacter spp</i> <i>Klebsiella spp</i>	<i>Enterococcus spp</i> <i>Bacteroides fragilis</i> <i>Salmonella spp</i>
Mokraćni sustav 10 – 30%	<i>E.coli</i> <i>Proteus spp</i> <i>Klebsiella spp</i> <i>Pseudomonas spp</i> <i>Enterobacter spp</i>	<i>Serratia spp</i> <i>Enterococcus spp</i>
Infekcije mekih tkiva 5 – 10%		<i>S.aureus</i> <i>S. epidermidis</i> <i>Clostridium spp</i>

Sepsa nastaje kao posljedica interakcije između čimbenika virulencije mikroorganizama te obrambenog sustava organizma domaćina. Nastanak sepse složen je patogenetski proces koji se može podijeliti u tri dijela, ovisno o vremenu nastajanja. Sepsa započinje prodorom virulentnih mikroorganizama u primarno sterilna tkiva, na što uslijedi upalni odgovor. Obilan upalni odgovor praćen je hemodinamskim promjenama radi vazodilatacije i povećane permeabilnosti kapilara. Nastaju unutarstanična oštećenja organizma domaćina s razvojem disfunkcije i zatajenja organa i organskih sustava. Kao posljedica ulaska uzročnika u organizam dolazi do oslobađanja njegovih čimbenika virulencije (endotoksini,

egzotoksini, enzimi...), što pak za posljedicu ima stvaranje protuuplanih čimbenika od strane domaćina kao što su upalni citokini te interleukini, uključujući faktor tumorske nekroze i IL–1. Citokini uzrokuju adheziju neutrofila za endotel, aktiviraju sustav zgrušavanja što dovodi do stvaranja mikrotromba (2, 3). Uslijed nastalih promjena u kliničkoj se slici javljaju tresavica i vrućica te leukocitoza i pojava mladih neutrofila u laboratorijskim nalazima. Stvoreni citokini potiču stvaranje dušikova oksida koji uzrokuje vazodilataciju krvnih žila te dilataciju miokarda, što dovodi do pada perifernog otpora i hipotenzije. Također, nastaje i oštećenje endotela, promjene permeabilnosti membrane kapilara te izlazak tekućine u intersticij. Nadalje, neutrofili uzrokuju stvaranje slobodnih radikala kisika što vodi u daljnje oštećenje stanica tkiva. Stoga, za dijagnozu sepse potrebno je zadovoljiti sljedeće kriterije: vrućica iznad 38°C ili hipotermija ispod 36°C, tahikardija, tahipneja više od 20/min ili hiperventilacija uz parcijalni tlak ugljikovog dioksida (pCO₂) manji od 32 mmHg ili 4,27 kPa te nalaz leukocita više od 12x10⁹/L ili manje od 4x10⁹/L krvi ili više od 10% neutrofila u laboratorijskom nalazu diferencijalne krvne slike (2).

Bakterijemija je prisustvo vijabilnih mikroorganizama u krvi i nije sinonim za sepsu budući da sindrom sepse podrazumijeva i prisustvo sistemskog upalnog odgovora. Ako su u bolesnika sa izraženim sistemskim uplanim odgovorom hemokulture pozitivne, tada znače potvrdu dijagnoze sepse (4).

Liječenje sepse temelji se na eradikaciji uzročnika (primjenom antibiotika te po potrebi kirurškim zahvatom), održavanju hemodinamike (uporabom simpatikomimetika i nadoknadom tekućine) i liječenju organske disfunkcije. Liječenje započinje nakon postavljanja dijagnoze, a prije nalaza antibiograma, te se temelji na antibiotcima širokog spektra, što nazivamo empirijskom terapijom. Nakon dobivanja rezultata antibiograma, primjenjuje se ciljana antimikrobna terapija. Također, u svrhu eradikacije uzročnika ponekad je potreban i kirurški zahvat ili evakuacija gnojne kolekcije perkutanim postupcima drenaže (2).

Teška sepsa je definirana kao sepsa komplicirana s teškom disfunkcijom organa, epizodama hipotenzije, pogoršanjem stanja svijesti, povišenim razinama kreatinina ili

se može razviti diseminirana intravaskularna koagulacija s potrošnjom glavnih čimbenika zgrušavanja te obilnom posljedičnom fibrinolizom (1, 3).

Šok je definiran kao akutni, generalizirani poremećaj perfuzije svih organskih sustava koji, ako se nastavi, može uzrokovati teški poremećaj funkcije stanica i organa dovodeći do smrtnog ishoda koji nastupa zbog nemogućnosti zadovoljavanja metaboličkih potreba tkiva te zbog nemogućnosti odstranjivanja otpadnih produkata metabolizma iz tkiva. Septički šok je septički sindrom – sistemni odgovor organizma na sepsu karakteriziran sljedećim parametrima: klinički dokazana upala ili postojanje sumnje na upalu, temperatura viša od 38,5°C ili niža od 36,5°C, tahikardija više od 90/min, tahipneja više od 20/min te jedan od sljedećih dokaza neadekvatne perfuzije tkiva: poremećaj svijesti, hipoksemija (vrijednosti PaO₂ manje od 75 mmHg ili 10 kPa), povišena vrijednost laktata u plazmi (više od 2,5 mmol/L) i oligurija (diureza manja od 30 ml/sat ili diureza manja od 0,5mL/kg/sat) – praćen padom vrijednosti sistoličkog tlaka za 40 ili više mmHg ili vrijednostima sistoličkog tlaka koje su niže od 90 mmHg te unatoč primjeni adekvatne terapije ne dolazi do poboljšanja. Najčešći uzročnici septičkog šoka su Gram negativne bakterije koje oslobađanjem svojih toksina izravno, ali i putem oslobađanja različitih posrednika upale, uzrokuju teške poremećaje kardiovaskularnog sustava (5).

U veljači 2016. godine u časopisu The Journal of the American Medical Association objavljene su nove definicije sepse i septičkog šoka (6). Nova definicija sepse definira sepsu kao stanje životno ugrožavajuće disfunkcije organa uzrokovano neadekvatnom regulacijom odgovora organizma domaćina na infekciju (6). Disfunkcija organa temelji se na akutnoj promjeni u vrijednosti SOFA (Sequential Organ Failure Assessment) zbroja bodova (SOFA score) za dva ili više boda. Osnovni SOFA score iznosi nula, osim ako bolesnik ima već ima postojeću organsku disfunkciju i prije nastupa infekcije (6). Pojednostavnjena verzija SOFA scorea je quick SOFA score (qSOFA) koja omogućava brzu identifikaciju bolesnika s visokim rizikom od smrti. qSOFA temelji se na promijenama u mentalnom statusu, vrijednosti sistoličkog tlaka koje su veće ili jednake 100 mmHG i frekvenciji disanja većoj ili jednakoj 22/min (6). Osim nove definicije sepse, predložena je i nova definicija septičkog šoka koji je definiran kao podvrsta sepse u kojoj su stanične i metaboličke

promjene povezane s većim mortalitetom. Sumnja na septički šok postavlja se na temelju perzistirajuće hipotenzije koja zahtijeva primjenu vazopresora kako bi srednji arterijski tlak (mean arterial pressure, MAP) bio veći ili jednak 65 mmHg te na temelju razine serumskih laktata većoj od 2 mmol/L koji perzistiraju i nakon adekvatne naknade volumena (6).

Najčešći uzročnici sepse su Gram negativne bakterije: *Escherichia coli*, *Acinetobacter spp*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas* i drugi članovi skupine Gram negativnih bacila. To su oportunistički patogeni koji često uzrokuju nozokomijalne infekcije, osobito u mehanički ventiliranih bolesnika, u bolesnika s opeklinama te u bolesnika s kroničnim bolestima. Dijagnoza se postavlja na osnovi mikrobiološkog nalaza kulture. Izbor antibiotika ovisi o uzročniku i mora se rukovoditi nalazom antibiograma jer je česta rezistencija. *P. aeruginosa* osobito je čest uzročnik infekcija u jedinicama intenzivne skrbi, u bolesnika kod kojih je narušena tkivna barijera. primjerice radi prisustva endotrahealnog tubusa, urinarnog katetera, centralnog venskog katetera i drugo (7). *Escherichia coli* je najbrojniji aerobni komezal koji nastanjuje debelo crijevo. Međutim, ako se normalna anatomska barijera probavnog sustava ošteti (npr. uslijed ishemije, upalne bolesti crijeva, ozljede), uzročnici se mogu proširiti na okolna tkiva ili ući u krvotok. Organski sustav koji je najčešće zaražen s *E. coli* je mokraćni sustav. Neki sojevi stvaraju toksine koji uzrokuju proljev, a svi sojevi izazivaju infekciju kad prodru u sterilna tkiva (8).

4. Hipoteza

Bolesnici s Gram negativnom sepsom uzrokovanom multirezistentnim bakterijskim sojevima imaju značajno veći smrtni ishod od bolesnika čija je sepsa uzrokovana osjetljivim sojevima Gram negativnih bakterija.

5. Ciljevi rada

5.1. Glavni cilj rada

Glavni cilj rada je istražiti te potvrditi ili odbaciti hipotezu da bolesnici s Gram negativnom sepsom uzrokovanom multirezistentnim bakterijskim sojevima imaju veći smrtni ishod od bolesnika čija je sepsa uzrokovana sojevima osjetljivima na niz antibiotika.

5.2. Specifični ciljevi

1. Opisati strukturu (udjele) pojedinih Gram negativnih bakterijskih vrsta izoliranih u hemokulturama bolesnika sa sepsom te njihovih profila rezistencije.
2. Analizirati vremenske trendove gore navedenih rezultata kroz trogodišnje razdoblje, od 01.01.2013. do 31.12.2015.
3. Procijeniti ishod bolesnika sa sepsom uzrokovanom različitim Gram negativnim vrstama mikroorganizama

6. Ispitanici i metode

Istraživanje je temeljeno na retrospektivnoj studiji u populaciji bolesnika hospitaliziranih u Zavodu za intenzivnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb u trogodišnjom razdoblju od 01.01.2013. do 31.12.2015. tijekom kojeg su zabilježene 1962 hospitalizacije. Od 1962 hospitalizacije u Zavodu, neki bolesnici su bili hospitalizirani samo u Zavodu, dok je veći broj bolesnika inicijalno bio hospitaliziran u nekom drugom Zavodu KBC Zagreb te premješten na nekoliko dana u Zavod za intenzivnu medicinu, nakon čega su ili bili vraćeni u Zavod na kojem su inicijalno bili smješteni ili su preminuli. Analizirani su podaci u bolesnika s pozitivnim hemokulturama. Budući da je vađenje hemokultura učinjeno u bolesnika s izraženim sistemskim upalnim odgovorom, može se smatrati da je u bolesnika s pozitivnim hemokulturama potvrđena dijagnoza sepe.

Podaci o broju bolesnika, izolatima te antibiogramima prikupljeni su iz bolničke medicinske dokumentacije, te su upisivani u Microsoft Excel u tabličnom obliku, a nakon toga statistički obrađeni statističkim programskim paketom SPSS verzija 16.0. Za usporedbu razlika proporcija korišten je χ -kvadrat test uz razinu značajnosti od $p < 0.05$ i $p < 0.001$. U tablicu su bili upisivani matični broj bolesnika, dob, ishod liječenja (otpust, premještaj ili smrtni ishod), te podaci o nalazima hemokultura. Izvađeni podaci bili su dostupni jedino liječnicima Zavoda za intenzivnu medicinu KBC Zagreb i autoru rada. Iz nalaza hemokultura bilježen je datum zaprimanja uzorka i datum izdavanja nalaza hemokultura, rezultat antibiograma, medij u kojemu je uzročnik pohranjen (aerobni ili anaerobni medij). Rezultat testiranja osjetljivosti na antibiotik interpretiran je u skladu s EUCAST – ovim (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) standardima, prema kojima je uzročnik osjetljiv, intermedijarno osjetljiv ili rezistentan. Ukoliko je izolirani uzročnik bio osjetljiv na tri ili više skupina antibiotika, taj bi izolat bio označen kao multirezistentan. U razmatranju antibiograma, odnosno multirezistencije kod bolesnika kod kojih je isti uzročnik (ponekad s malo promijenjenim profilom rezistencije) izoliran više puta u obzir je uzet antibiogram kronološki prvo izoliranog soja.

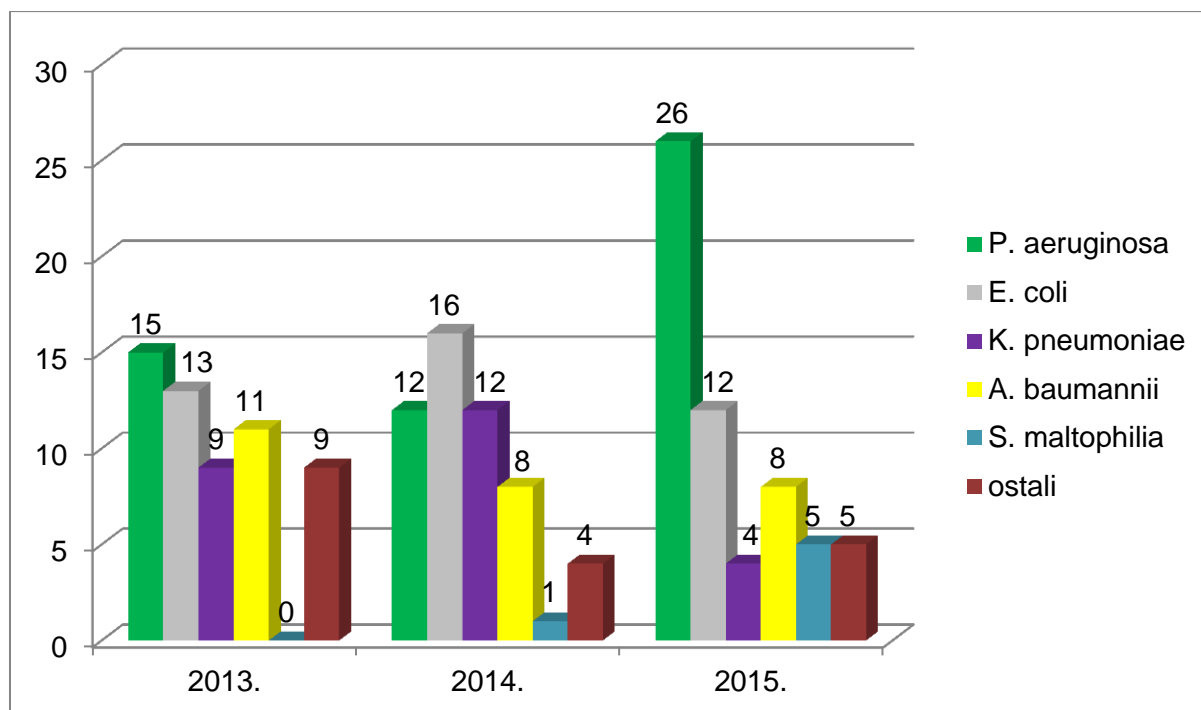
7. Rezultati

Tijekom trogodišnjeg razdoblja ukupan broj hospitalizacija u Zavodu za intenzivnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb iznosio je 1962. Raspodjela broja hospitalizacija po godinama zajedno s udjelom bolesnika s izoliranom Gram negativnom sepsom prikazan je u tablici 2.

Tablica 2. Udio bolesnika hospitaliziranih u Zavodu sa sepsom uzrokovanom Gram negativnim mikroorganizmom konstantan je kroz trogodišnje razdoblje i kreće se oko 7%

Godina	Udio bolesnika s Gram negativnom sepsom
2013.	48/611 (7.9%)
2014.	46/668 (6.9%)
2015.	50/683 (7.3%)

Među najčešćim izolatima hemokulture su *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp*, *Acinetobacter baumannii* te *Stenotrophomonas maltophilia*. U grafikonu 1 prikazana je raspodjela uzročnika gram negativnih sepsi prema bakterijskim vrstama, a u tablici 3 ovi su podaci prikazani tablično.



Grafikon 1. Raspodjela uzročnika gram negativnih sepsi prema bakterijskim vrstama u 2013., 2014. i 2015. godini: Vidi se porast udjela *Pseudomonasa* i *Stenotrophomonasa* kao uzročnika Gram negativne sepse

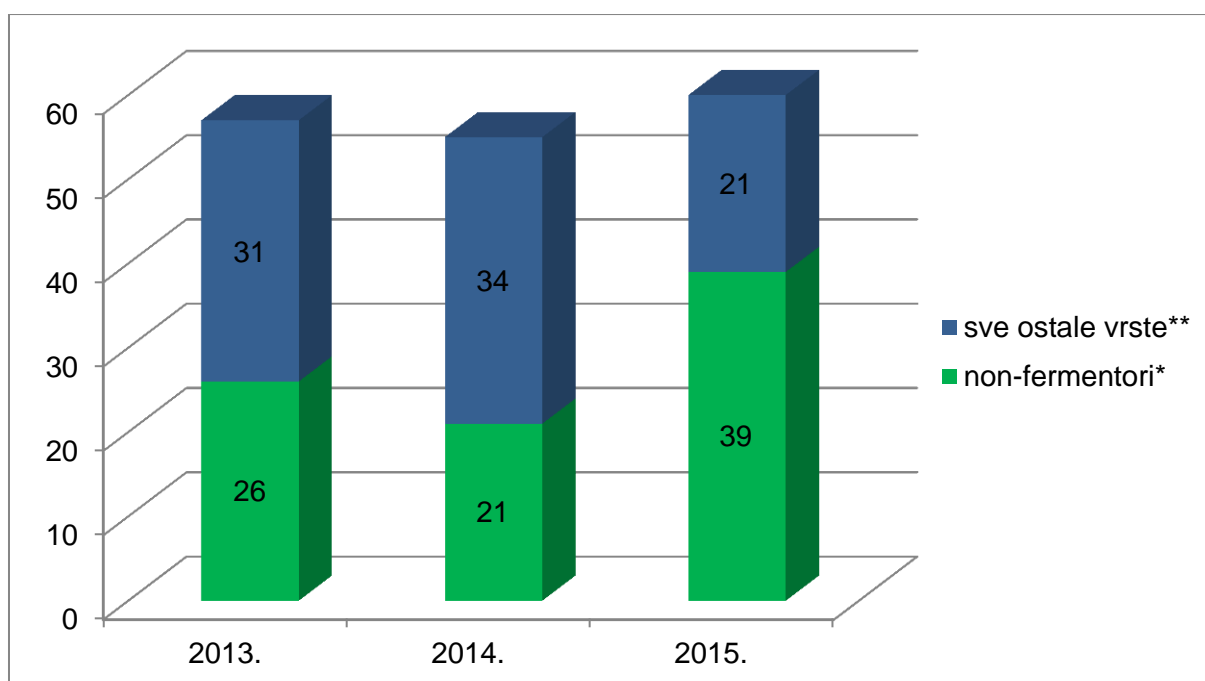
*Uključuju: *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus influenzae*

Tablica 3. Raspodjela uzročnika gram – negativnih sepsi prema bakterijskim vrstama u 2013., 2014. i 2015. godini: Porast udjela *Pseudomonasa* i *Stenotrophomonasa* kao uzročnika Gram negativne sepse

	2013.	2014.	2015.	ukupno
<i>P. aeruginosa</i>	15	12	26	53
<i>E. coli</i>	13	16	12	41
<i>Klebsiella spp.</i>	9	12	4	25
<i>A. baumannii</i>	11	8	8	27
<i>S. maltophilia</i>	0	1	5	6
ostale vrste*	9	4	5	18

Vidljiv je značajan porast učestalosti *P. aeruginosa* kao izolata u bolesnika s Gram negativnom sepsom, koji je 2015. godine bio etiološki čimbenik kod 26/60 bolesnika, što je značajno više nego 2013. godine (15/57) i 2014. godine (12/53). Razlika u odnosu na 2013. godinu je blizu razine statističke značajnosti ($p=0.053$, χ -kvadrat test), a u odnosu na 2014. je statistički značajna ($p=0.02$, χ -kvadrat test).

Pseudomonas se stoga ističe kao najvažniji uzročnik Gram negativne sepse, kako svojom učestalošću, tako i nepovoljnim profilom rezistencije na antibiotike (prikazano niže).

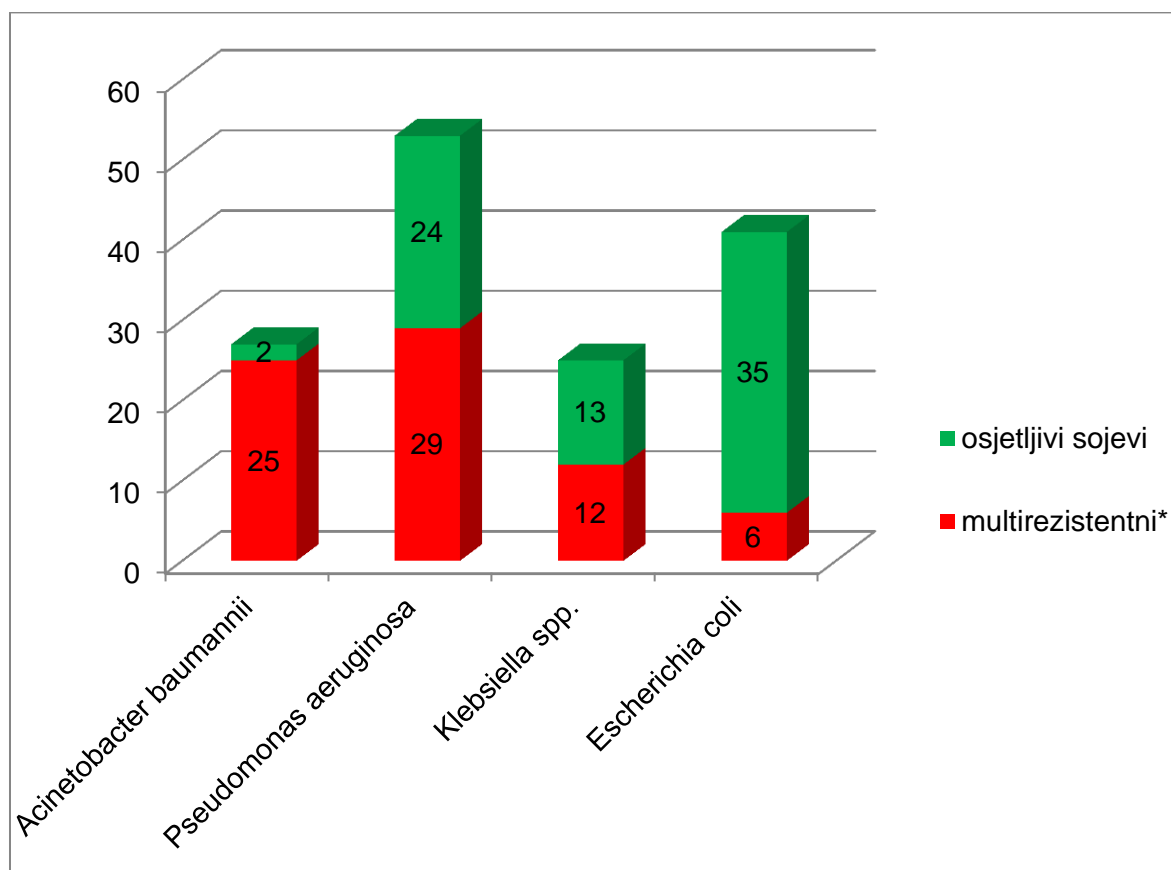


Grafikon 2. Dominacija non-fermentora: *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* i *Stenotrophomonas maltophilia*, kao uzročnika Gram negativne sepse bolesnika hospitaliziranih u Zavodu za intenzivnu medicinu KBC Zagreb

**Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Stenotrophomonas maltophilia*

***Escherichia coli*, *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Serratia marcescens*, *Neisseria meningitidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Haemophilus influenzae*

U grafikonu 2 prikazan je udio nonfermentora kao uzročnika Gram negativne sepse koji je u ove tri godine u porastu. Porats udjela non – fermentora kao uzročnika Gram negativne sepse je zabrinjavajući budući da je *Acinetobacter* gotovo uvijek multirezistentan, a često i ekstenzivno rezistentan, te da je *Pseudomonas* multirezistentan u više od polovice slučajeva, što se vidi u grafikonu 3.



Grafikon 3. Udjeli multirezistentnih izolata najčešćih uzročnika Gram negativne sepse zbirno, u trogodišnjem razdoblju

*multirezistentni izolati definirani su kao oni koji su rezistentni na predstavnike tri ili više skupina antibiotika

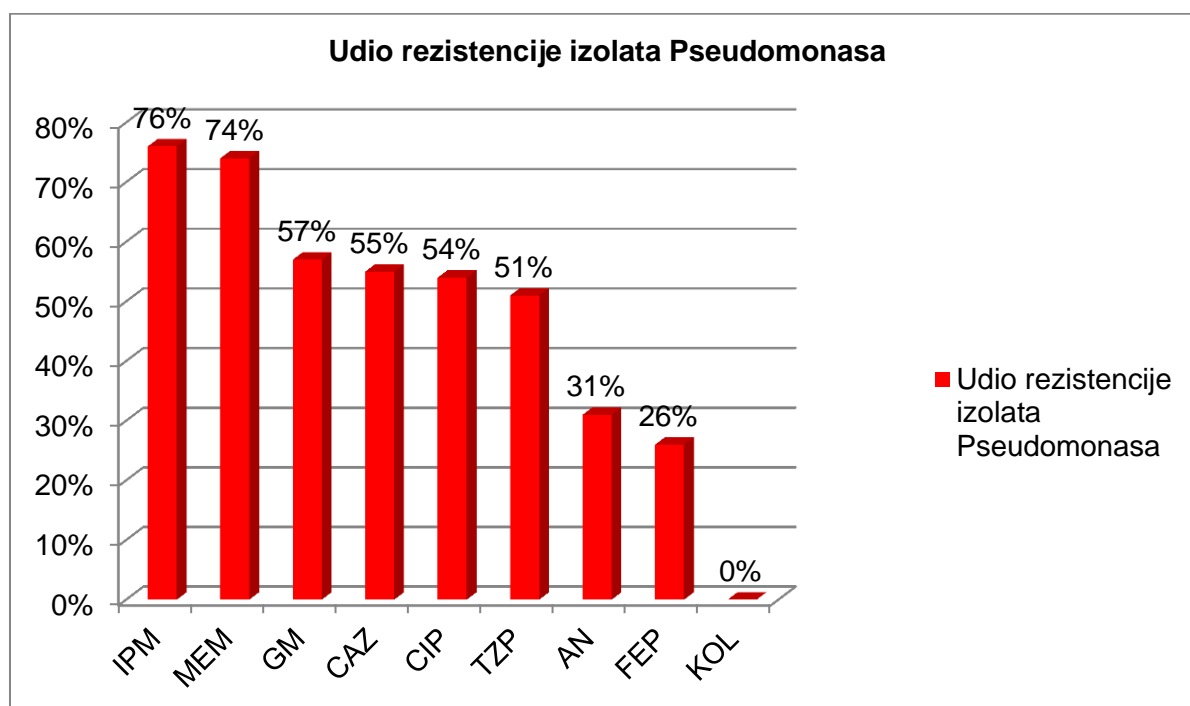
Izolati *A. baumannii* su statistički značajno češće multirezistentni nego izolati *Pseudomonasa*, *Klebsielle* i *E. coli* ($p < 0.001$).

Izolati *Pseudomonasa* nisu statistički značajno češće multirezistentni nego izolati *Klebsielle* ($p=0.307$), ali su značajno češće multirezistentni od *E. coli* ($p=0.000067$, $p<0.001$).

Izolati *Klebsielle* su statistički značajno češće multirezistentni nego izolati *E. coli* ($p=0.003$, $p<0.05$).

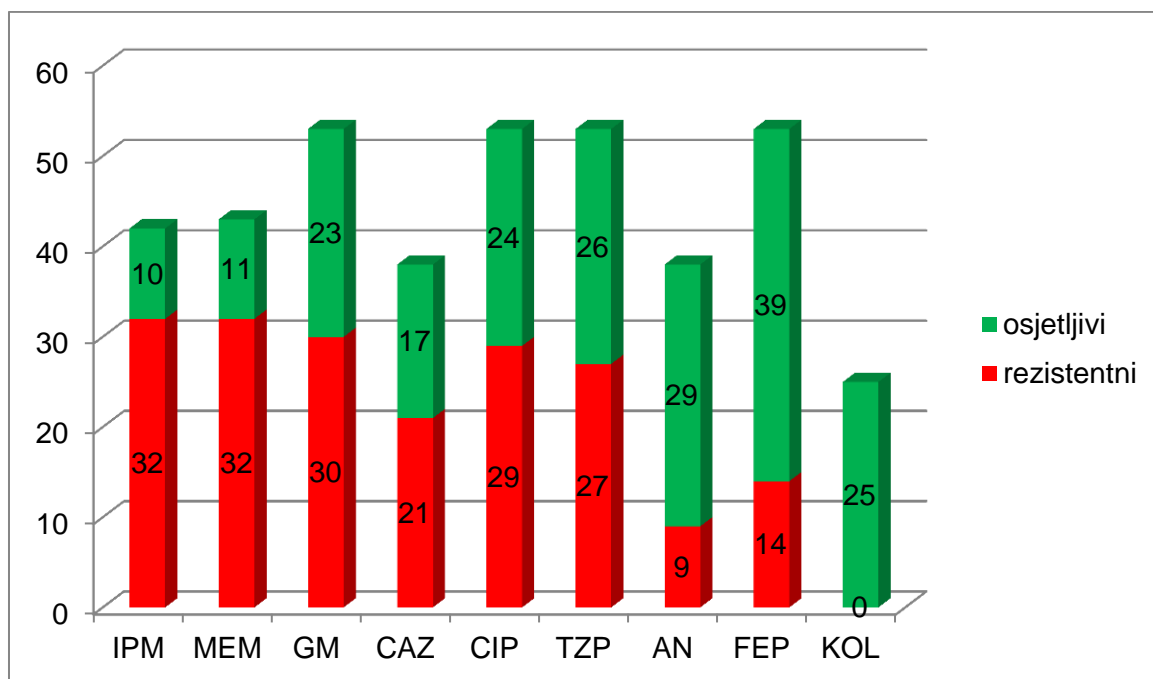
Pseudomonas aeruginosa se uz *Acinetobacter baumannii* ističe kao najvažniji uzročnik Gram negativne sepse u Zavodu za intenzivnu medicinu.

U grafikonu 4 i 5 prikazan je profil rezistencije za *P. aeruginosa* u udjelima i apsolutnim brojevima rezistentnih izolata.



Grafikon 4. Profil rezistencije *P.aeruginosa* u periodu 2013. – 2015. u bolesnika s Gram negativnom sepsom u Zavodu za intenzivnu medicinu KBC Zagreb

Legenda: IPM – imipenem, MEM – meropenem, GM – gentamicin, CAZ – ceftazidim, CIP – ciprofloksacin, TZP – piperacilin/tazobaktam, AN – amikacin, FEP – cefepim, KOL – kolistin



Grafikon 5. Profil rezistencije *P. aeruginosa* u periodu 2013. – 2015. u bolesnika s Gram negativnom sepsom u Zavodu za intenzivnu medicinu KBC Zagreb

Legenda: IPM – imipenem, MEM – meropenem, GM – gentamicin, CAZ – ceftazidim, CIP – ciprofloksacin, TZP – piperacilin/tazobaktam, AN – amikacin, FEP – cefepim, KOL - kolistin

Iz podataka proizlazi da kod sumnje na sepsu uzrokovanu *Pseudomonasom* treba empirijski propisivati amikacin ili cefepim, a izbjegavati karbapeneme.

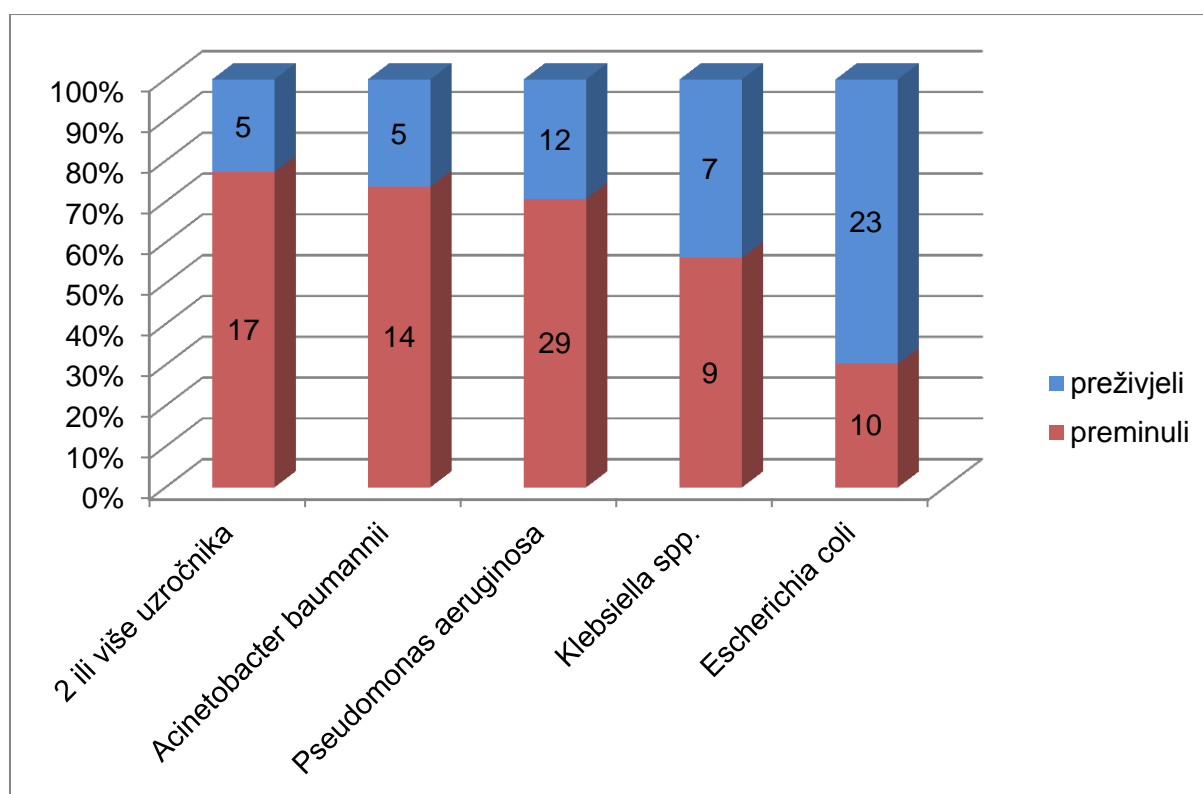
Udio rezistencije *P.aeruginosa* na karbapeneme je značajno češći nego na gentamicin ($p=0.04645$, $p<0.05$), odnosno značajno je češći nego na sve druge antibiotike ($p<0.05$), a nasuprot amikacina, cefepima i kolistina je razlika još više statistički značajna ($p=0.000003$, $p<0.001$).

Važno je istaknuti činjenicu da je polovica (19/27) izolata *Acinetobacteria* bila ekstenzivno rezistentna, odnosno da su bili osjetljivi samo na kolistin. Šest od 53 izolata *Pseudomonasa* bilo je osjetljivo samo na kolistin, što je značajno manje nego kod *Acinetobacteria* ($p=0.00003$, $p<0.001$), a dodatnih pet izolata bilo je osjetljivo

samo na kolistin i amikacin. Za razliku od toga, samo je jedan izolat *Klebsiela* (KPC soj) bio rezistentan na sve antibiotike osim kolistina i amikacina (ekstenzivna rezistencija).

Kod 25/170 (14.7%) epizoda sepse u periodu 2013. – 2015. kolistin je bio jedina terapijska opcija za liječenje Gram negativne sepse.

U grafikonu 6 prikazana je ovisnost smrtnog ishoda o vrsti izoliranog mikroorganizma iz hemokulture.



Grafikon 6. Usporedba mortaliteta bolesnika s Gram negativnom sepsom u periodu 2013.-2015. s obzirom na etiološki uzročnik (iz analize su isključeni bolesnici s više od jednog Gram negativnog uzročnika u HK)

Mortalitet bolesnika s Gram negativnom sepsom ovisi o uzročniku: kod sepse uzrokovane non-fermentorima iznosi oko 71 – 74%, dok je niži kod *Klebsiella* (56%) i statistički značajno niži kod *E. coli* (30%, $p=0.000116$, $p<0.001$).

Udjeli mortaliteta poklapaju se s udjelima multirezistencije odnosno najveći je kod *Acinetobacteria*, nakon kojeg slijede *Pseudomonas*, *Klebsiella* i *E. coli*.

Najveći je mortalitet zabilježen kod bolesnika s 2 ili više izoliranih Gram negativnih uzročnika u HK (77%).

U tablici 4 prikazan je odnos multirezistencije izoliranih uzročnika i smrtnog ishoda.

Tablica 4. Prikaz smrtnosti obzirom na prisustvo/odsustvo multirezistencije u vremenskom periodu od 2013.-2015.

Bakterijska vrsta	Udio preminulih
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> - multirezistentni	25/29
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> –bez multirezistencije	13/24
<i>Klebsiella spp.</i> – multirezistentni	7/12
<i>Klebsiella spp.</i> – bez multirezistencije	7/13

Podaci za *E. coli* nisu analizirani zbog malog broja (šest) bolesnika s multirezistentnim sojevima, te statistička analiza nije bila moguća. Podaci za *Acinetobacter baumannii* također nisu uvršteni u tablicu zbog toga što su gotovo svi multirezistentni.

Analizom podataka u Tablici 4. vidljivo je da je smrtnost kod bolesnika sa Gram negativnom sepsom uzrokovanom *Pseudomonasom* značajno viši ukoliko se radi o multirezistentnom *Pseudomonasu* ($p=0.00995$, $p<0.05$).

Ako se izdvoje bolesnici s Gram negativnom sepsom kod kojih je u hemokulturama izoliran samo jedan uzročnik, te promatra ishod ovisno o rezistenciji izoliranog uzročnika, nalazi se značajno veća učestalost smrtnog ishoda u bolesnika s Gram negativnom sepsom uzrokovanom rezistentnim uzročnikom upotrebom χ kvadrat testa, $p<0.00001$. Rezultati su prikazani u tablici 5.

Tablica 5. Prikaz smrtnosti obzirom na rezistentnost ili osjetljivost izoliranih uzročnika Gram negativne sepe

	Rezistentni		Osjetljivi	
	Umrli	Svi	Umrli	Svi
<i>P.aeruginosa</i>	21	25	0	0
<i>Klebsiella</i>	6	9	3	9
<i>A.baumannii</i>	14	18	0	1
<i>E.coli</i>	3	3	9	33
<i>S.maltophilia</i>	2	3	0	0
Ostali	4	4	4	10
Ukupno	50 (81%)	62	16 (30%)	53

8. Rasprava

Retrospektivnom analizom hospitaliziranih bolesnika u Zavodu za intenzivnu medicinu Kliničkog bolničkog centra Zagreb tijekom trogodišnjeg razdoblja, od 01.01. 2013. do 31.12. 2015. godine zabilježili smo 1962 hospitalizacije. U 7% bolesnika registrirana je sepsa uzrokovana Gram negativnim uzročnikom, što je podjednako za sve godine promatranog razdoblja. Promatrajući izolirane uzročnike iz hemokulture, primijetili smo dominaciju izolata bakterije *P. aeruginosa*, nakon koje redom slijede *E. coli*, *A. baumannii* i *Klebsiella spp.* Prema literaturnim podacima, ova četiri uzročnika navode se kao najčešći uzročnici Gram negativne sepe, iako *P. aeruginosa* nije uvijek najčešći izolirani uzročnik. U literaturnim navodima često je najčešći uzročnik *A. baumannii*, i to redom u slijedećim zemljama: Indija (dva rada), zemlje Južne Amerike, Grčka, Turska (9 – 13). Sligl 2006. (Kanada) i Ak (Turska) izvještavaju o *P. aeruginosa* kao najčešće izoliranom Gram negativnom uzročniku sepe (14, 15). U kasnijim radovima Sligla 2015. godine najčešći uzročnik bila je *E. coli* (16), koja je i najčešće izolirani uzročnik prema izvještajima Karakoca i suradnika (Turska) (17). *Klebsiella* je rjeđe navedena kao najčešći uzročnik Gram negativne sepe u radu iz Libije (18).

U našem radu kroz promatrano razdoblje primijetili smo porast učestalosti sepse uzrokovane s *P. aeruginosa* i općenito nonfermentora, što je nepovoljno budući da je učestalost rezistencije u nonfermentora najviša. Ove bakterije predstavljaju poseban problem u kontekstu zbrinjavanja bolesnika hospitaliziranih u jedinicama intenzivne skrbi budući da su mogući kontaminanti bolničke opreme (uključujući sredstva za dezinfekciju, opremu vezanu za mehaničku ventilaciju itd.) te nerijetko koloniziraju i bolesnike i medicinsko osoblje. Nakon izolacije nekog od navedenih uzročnika iz nekog od bioloških uzoraka problem terapije je dvojak: 1. rezistencija na niz antibiotika ne ostavlja puno prostora za izbor antibiotika, zbog čega se koriste tzv. rezervni antibiotici, čime se dodatno pogoršava epidemiološka slika nozokomijalnih patogena; 2. kolonizaciju često nije lako razlučiti od infekcije. Gram negativna bakterija s najvećim udjelom multirezistentnih izolata je *A. baumannii*, zatim *P. aeruginosa*, a potom slijede *Klebsiella pneumoniae* i *E. coli*.

Promatranjem udjela rezistencije izoliranih uzročnika na pojedine antibiotike za *P. aeruginosa* dobili smo nalaz najveće rezistencije na imipenem, što je sukladno s ostalim rezultatima navedenim u literaturi iz Kanade i Italije, za svaku zemlju navedena su po dva istraživanja (14, 19, 17, 20). U literaturi iz Kanade se navodi sličan udio rezistencije na ciprofloksacin kao i u našem radu (21). Najmanje je izolata bilo rezistentno na kolistin što je također u skladu s literaturnim navodima iz Libije i Turske (18, 22). U ovom istraživanju nismo zabilježili izolat *P. aeruginosa* rezistentan na kolistin. Najveća rezistencija nalazi se u *Acinetobacteria* koji je obično osjetljiv samo na kolistin, što je sukladno literaturnim podacima; u ovom radu samo je jedan izolat *Klebsiella* (KPC soj) bio rezistentan na sve antibiotike, osim kolistina i amikacina, dok je u literaturi iz Italije (dva istraživanja), Turske i Poljske udio rezistencije *Klebsiella* veći (20, 23, 24, 25). Stoga je kolistin „zadnja linija obrane“ u slučajevima Gram negativne sepse uzrokovanih ekstenzivno rezistentnim non – fermentorima, zbog čega, unatoč svojoj nefrotoksičnosti i neurotoksičnosti, postaje sve češće upotrebljavan u jedinici intenzivne skrbi.

Pokazali smo da je udio smrtnog ishoda u bolesnika sa sepsom uzrokovanom multirezistentnim *P. aeruginosa* iznosio čak 86%, za razliku od osjetljivog *P. aeruginosa* kod kojeg je udio smrtnog ishoda 54%. Razlika je visoko statistički

značajna. Ovaj nalaz je očekivan i logičan budući da multirezistencija znači veću vjerojatnost neuspješne empirijske antibiotske terapije, a upravo je kod bolesnika sa sepsom za dobar terapijski odgovor ključan dobar odabir antibiotika. Također, budući da se terapija Gram negativne sepse dominantno oslanja na karbapeneme, a nalazimo visoki udio rezistencije *Pseudomonasa* na karbapeneme, ne iznenađuje rezultat visoke smrtnosti sepse uzrokovane ovim uzročnikom. U radu talijanskih autora postotak umrlih prilikom infekcije multirezistentnim *Pseudomonasom* iznosio je 42% (26). S druge strane, razlika između smrtnosti kod izolacije multirezistentne i osjetljive *Klebsiella spp* nije se značajno razlikovala. Slični su rezultati dobiveni u istraživanjima Candevir Ulu (Turska) i Chetcuti Zammit (Malta) (23, 27).

Isto tako, najveća smrtnost (77%) očekivano se nalazi u bolesnika s miješanom Gram negativnom sepsom kod koje postoje izolati dva ili više gram negativnih bakterija.

Razliku smrtnosti ovisno o tipu rezistencije u bolesnika sa sepsom uzrokovanom *E. coli* nismo analizirali radi malog udjela rezistencije izolata *E. Coli*, a također nije bilo smisla ovu analizu učiniti kod izolata *A. baumannii* budući su gotovi svi izolati bili multirezistentni. Multirezistentni izolati *A. baumannii* navodi se u radu Michalopoulos A i suradnika (Grčka) iz 2011. godine (28), dok se ne nalazi u radu Pradhan NP i suradnika (Indija) iz 2014. godine (12).

U ovom radu pokazano je da je udio smrtnog ishoda proporcionalan udjelu izoliranih multirezistentnih mikroorganizama. Smrtnost je najveća kod izolata *A. baumannii* iz hemokultura, nakon čega slijede *P. aeruginosa*, *Klebsiella spp* i konačno *E. coli*.

Može se zaključiti da je izgled za uspješnu empirijsku antibiotsku terapiju manja kod bolesnika sa sepsom uzrokovanom non-fermentorima nego kod bolesnika s drugim uzročnicima.

9. Zaključci

Nakon provedenog istraživanja i obrade rezultata, dokazali smo da bolesnici s Gram negativnom sepsom koja je uzrokovana multirezistentnim bakterijskim sojevima imaju značajno veću smrtnost od bolesnika čija je sepsa uzrokovana osjetljivom sojevima pojedinih vrsta Gram negativnih bakterija.

Pseudomonas aeruginosa je najčešći izolat u bolesnika s Gram negativnom sepsom, s visokim udjelom rezistencije, odmah nakon *Acinetobacteria*. Najveća je rezistencija opažena u sepsi uzrokovane non – fermentorima koji nose i najveći rizik smrtnog ishoda.

Učestalost izolata *P. aeruginosa* u bolesnika s Gram negativnom sepsom raste kroz promatrano razdoblje od tri godine.

Ishod je najnepovoljniji kod miješane Gram negativne sepse uzrokovane s dva ili više uzročnika, a od pojedinačnih uzročnika najnepovoljniji je kod infekcije uzrokovane nonfermentorima *P. aeruginosa* i *A. baumannii* u kojih je i udio rezistencije najveći.

10. Zahvale

Zahvaljujem mentoru prof. dr.sc. Radovanu Radoniću za pristanak na mentorstvo, za svo vrijeme i savjete koje mi je nesebično pružio. Ovaj rad također ne bi bio potpun bez velike pomoći dr.sc. Luke Bielena koji je dopunio osmišljavanje rada te je učinio statističku analizu dobivenih rezultata. Osim toga, htjela bih se zahvaliti i dr. Dijani Vardi – Brkić s Kliničkog zavoda za kliničku i molekularnu mikrobiologiju na dijelu ustupljenih podataka. Hvala i mojoj mami koja mi je kroz cijeli život i studij bila velika i neprocijenjiva podrška. Za kraj, hvala svim mojim prijateljima, kolegama i ostalim dragim ljudima kojima sam zahvalna na svojoj podršci i razumijevanju.

11. Literatura

1. Kalil A, MD, MPH; Bailey K L, MD. Septic shock, [pristupljeno: 10. 04. 2016.]. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/168402-overview#a3>
2. Ivanović D, Baršić B. Sepsa. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008., 4.izdanje, 391 – 397
3. MSD Priručnik dijagnostike i terapije. Sepsa i septični šok. [pristupljeno: 10. 04. 2016.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/kriticna-stanja/sepsa-i-septicni-sok>
4. Bennett N J, MBBCh, PhD, MA(Cantab), FAAP; Domachowske J, MD; Holland B J, MD. Bacteremia. [pristupljeno: 10. 04. 2016.]. Dostupno na: <http://emedicine.medscape.com/article/961169-overview>
5. Ivanović D., Radonić R. Šok, septički šok. U: Vrhovac B, Jakšić B, Reiner Ž, Vucelić B. Interna medicina. Zagreb: Naklada Ljevak; 2008., 4.izdanje, 406 – 408
6. Singer M, Deutschman S C, Seymour W C i sur. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). JAMA. 2016;315(8):801-810. doi:10.1001/jama.2016.0287.
7. MSD Priručnik dijagnostike i terapije. Pseudomonas i srodne infekcije. [pristupljeno: 10. 04. 2016.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/gram-negativni-bacili/pseudomonasne-i-srodne-infekcije>
8. MSD Priručnik dijagnostike i terapije. Escherichia coli. [pristupljeno: 10. 04. 2016.]. Dostupno na: <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/gram-negativni-bacili/escherichia-coli>
9. Mitharwal SM, Yaddanapudi S, Bhardwaj N, Gautam V, Biswal M, Yaddanapudi L. Intensive care unit-acquired infections in a tertiary care hospital: An epidemiologic

survey and influence on patient outcomes. *Am J Infect Control*. 2016 Mar; 1:1527-3296. doi: 10.1016/j.ajic.2016.01.021.

10. Luna CM, Rodriguez-Noriega E, Bavestrello L, Guzmán-Blanco M. Gram-negative infections in adult intensive care units of latin america and the Caribbean. *Crit Care Res Pract*. 2014;2014:480463. doi: 10.1155/2014/480463.

11. Vardakas KZ, Rafailidis PI, Konstantelias AA, Falagas ME. Predictors of mortality in patients with infections due to multi-drug resistant Gram negative bacteria: the study, the patient, the bug or the drug? *J Infect*. 2013 May;66(5):401-14. doi: 10.1016/j.jinf.2012.10.028.

12. Pradhan NP, Bhat SM, Ghadage DP. Nosocomial infections in the medical ICU: a retrospective study highlighting their prevalence, microbiological profile and impact on ICU stay and mortality. *J Assoc Physicians India*. 2014 Oct;62(10):18-21.

13. Senbayrak Akcay S, Inan A, Cevan S i sur. Gram-negative bacilli causing infections in an intensive care unit of a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey. *J Infect Dev Ctries*. 2014 May 14;8(5):597-604. doi: 10.3855/jidc.4277

14. Sligl W, Taylor G, Brindley PG. Five years of nosocomial Gram-negative bacteremia in a general intensive care unit: epidemiology, antimicrobial susceptibility patterns, and outcomes. *Int J Infect Dis*. 2006 Jul;10(4):320-5.

15. Ak O, Batirel A, Ozer S, Çolakoğlu S. Nosocomial infections and risk factors in the intensive care unit of a teaching and research hospital: a prospective cohort study. *Med Sci Monit*. 2011 May;17(5):PH29-34.

16. Sligl WI, Dragan T, Smith SW. Nosocomial Gram-negative bacteremia in intensive care: epidemiology, antimicrobial susceptibilities, and outcomes. *Int J Infect Dis*. 2015 Aug;(37):129-34. doi: 10.1016/j.ijid.2015.06.024

17. Karakoc C, Tekin R, Yeşilbağ Z, Cagatay A. Risk factors for mortality in patients with nosocomial Gram-negative rod bacteremia. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2013 Apr;17(7):951-7.
18. Zorgani A, Abofayed A, Glia A, Albarbar A, Hanish S. Prevalence of Device-associated Nosocomial Infections Caused By Gram-negative Bacteria in a Trauma Intensive Care Unit in Libya. *Oman Med J*. 2015 Jul;30(4):270-5. doi: 10.5001/omj.2015.54
19. Buccoliero G, Morelli E, Romanelli C, Lonero G, Pisconti S, Resta F. Susceptibility rate to tigecycline and antibiotic-resistance among *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Intensive Care Unit. *Recenti Prog Med*. 2012 Jul-Aug;103(7-8):275-8. doi: 10.1701/1127.12430
20. Russotto V, Cortegiani A, Graziano G i sur. Bloodstream infections in intensive care unit patients: distribution and antibiotic resistance of bacteria. *Infect Drug Resist*. 2015 Aug 10;8(8):287-96. doi: 10.2147/IDR.S48810
21. Levin PD, Fowler RA, Guest C, Sibbald WJ, Kiss A, Simor AE. Risk factors associated with resistance to ciprofloxacin in clinical bacterial isolates from intensive care unit patients. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2007 Mar;28(3):331-6.
22. Taşbakan MS, Pullukçu H, Ekren PK i sur. Colistin use in ventilator-associated pneumonia due to panresistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Mikrobiyol Bul*. 2009 Jan;43(1):61-70
23. Candevir Ulu A, Kurtaran B, Inal AS i sur. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection: a serious threat in ICUs. *Med Sci Monit*. 2015 Jan 17;21(21):219-24. doi: 10.12659/MSM.892516
24. Delle Rose D, Sordillo P, Gini S i sur. Microbiologic characteristics and predictors of mortality in bloodstream infections in intensive care unit patients: A 1-year, large,

prospective surveillance study in 5 Italian hospitals. *Am J Infect Control*. 2015 Nov 1;43(11):1178-83. doi: 10.1016/j.ajic.2015.06.023

25. Sękowska A, Gospodarek E, Kusza K. The prevalence of infections and colonisation with *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in ICU patients. *Anaesthesiol Intensive Ther*. 2014 Sep-Oct;46(4):280-3. doi: 10.5603/AIT.2014.0045.

26. Tumbarello M, De Pascale G, Trecarichi EM i sur. Clinical outcomes of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in intensive care unit patients. *Intensive Care Med*. 2013 Apr;39(4):682-92. doi: 10.1007/s00134-013-2828-9

27. Chetcuti Zammit S, Azzopardi N, Sant J. Mortality risk score for *Klebsiella pneumoniae* bacteraemia. *Eur J Intern Med*. 2014 Jul;25(6):571-6. doi: 10.1016/j.ejim.2014.04.008.

28. Michalopoulos A, Falagas ME, Karatza DC i sur. Epidemiologic, clinical characteristics, and risk factors for adverse outcome in multiresistant gram-negative primary bacteremia of critically ill patients. *Am J Infect Control*. 2011 Jun;39(5):396-400. doi: 10.1016/j.ajic.2010.06.017

12. Životopis

Rođena sam 01.04.1991. u Zagrebu u Republici Hrvatskoj.

Pohađala sam Osnovnu školu Eugena Kumičića u Velikoj Gorici u razdoblju od 1998. do 2006. Svoje obrazovanje nastavljam u Gimnaziji Velika Gorica, smjer opća gimnazija, koju završavam 2010. te iste godine upisujem Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studiranja bila sam član studentske udruge CroMSIC od 2010. do 2015. te sam u tim razdobljima obnašala dužnosti asistenta lokalnog dužnosnika za ljudska prava i mir (Local officer for Human Rights and peace Assistant, akademska godina 2012./2013.), asistenta lokalnog dužnosnika za razmjene (Local exchange officer Assistant, akademska godina 2013./2014.), a u akademskoj godini 2014./2015. bila sam Dužnosnik za treninge. Nadalje, bila sam aktivni član i dio vodstva Studentske sekcije za anesteziologiju te sam sudjelovala u pisanju tekstova za studentski časopis Medicinar. Sudjelovala sam na brojnim kongresima kao aktivni i pasivni sudionik te sam također sudjelovala u programu međunarodne razmjene studenata u sklopu koje sam provela mjesec dana u Istanbulu, Turska. U akademskoj godini 2015./2016. te 2016./2017. bila sam demonstrator na predmetu Temelji liječničkog umijeća.

Aktivno se služim engleskim i turskim jezikom, pasivno njemačkim i talijanskim.